

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152522

厦门大学

硕士学位论文

金属离子铜锌与 A β 多肽相互作用的电喷雾 质谱应用研究

Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry
for Studying Cu²⁺, Zn²⁺ and Amyloid β -Peptide Complexes

晋文慧

指导教师姓名: 韩大雄 副教授

专业名称: 药物化学

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩时间: 2010 年 5 月

2010 年 月



**Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry
for Studying Cu^{2+} , Zn^{2+} and Amyloid β -Peptide Complexes**

Dissertation Submitted to

Xiamen University

In partial fulfillment of the requirement

For the degree of

By

Wenhui Jin

Dissertation Supervisor: Prof. Daxiong Han

At

Department of Pharmacy, Xiamen University

June, 2010

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要	I
Abstract	III
符号缩写表	V
第一章 绪论	1
1.1 老年痴呆症	1
1.1.1 AD 的病理特征	2
1.1.2 AD 致病机理	3
1.2 电喷雾质谱	7
1.2.1 电喷雾电离技术的发展简介	7
1.2.2 电喷雾电离的机理	8
1.2.3 非共价相互作用	11
1.3 本论文的主要研究内容	15
1.3.1 A β 多肽与金属离子非共价复合物的 ESI-MS 研究	15
1.3.2 金属离子与 A β 多肽结合位点的的串联多级质谱 ESI-MS ⁿ 研究 ..	15
1.3.3 电喷雾质谱研究铜锌与 A β 肽相互作用中竞争取代效应	16
参考文献	17
第二章 A β 多肽与金属离子非共价复合物的 ESI-MS 研究	25
2.1 引言	25
2.2 实验部分	26
2.2.1 样品与试剂	26
2.2.2 仪器与实验条件	27
2.2.3 样品制备	27
2.3 结果与讨论	28
2.3.1 A β (10-21)多肽峰	28
2.3.2 表征 A β (10-21)多肽与金属离子非共价复合物结构的 ESI-MS 谱分	
析	30

2.3.3 质谱测定参数对 A β -M 非共价复合物质谱峰的影响.....	31
2.3.4 溶液 pH 值及混合浓度比例对非共价复合物 ESI-MS 谱的影响....	35
2.3.5 有机溶剂比例对 A β -M 非共价复合物 ESI-MS 谱的影响.....	41
2.4 小结	43
参考文献	45
第三章 金属离子与 Aβ 多肽结合位点的串联质谱 ESI-MSⁿ 研究	47
3.1 前言	47
3.2 A β (10-21)多肽质谱碎裂规律部分.....	49
3.2.1 仪器与试剂.....	49
3.2.2 实验方法.....	49
3.2.3 结果与讨论.....	49
3.3 实验部分	53
3.3.1 样品与试剂.....	53
3.3.2 样品制备.....	53
3.3.3 仪器与实验条件.....	53
3.4 结果与讨论	54
3.4.1 锌的结合位点的测定.....	54
3.4.2 铜的结合位点的测定.....	58
3.5 小结	60
参考文献	61
第四章 利用电喷雾质谱研究铜锌与 Aβ 多肽相互作用中的竞争取代效应	62
4.1 前言	62
4.2 实验部分	64
4.2.1 样品与试剂.....	64
4.2.2 仪器与实验条件.....	64
4.2.3 样品制备.....	65
4.3 结果与讨论	66

4.3.1 实验条件对竞争实验的影响.....	66
4.3.2 A β (10-21)多肽和铜与锌的竞争.....	66
4.3.3 多肽浓度与对比对测定结果的影响.....	67
4.3.4 体系摩尔比例对竞争取代结果的影响.....	69
4.3.5 孵育时间对竞争取代结果的影响.....	72
4.4 小结	73
参考文献	75
第五章 总结.....	78
附录	80
在学期间论文	89
致谢	90

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviation	V
Chapter 1 Prolegomenon	1
1.1 AD	1
1.1.1 Pathological features of AD	2
1.1.2 Pathogenesis of AD	3
1.2 ESI-MS	7
1.2.1 Development profile of ESI-MS	7
1.2.2 Electrospray ionization mechanism	8
1.2.3 Non-covalent interaction	11
1.3 The main contents of this paper	15
1.3.1 Study non-covalent complexes of A β peptide with metal ions by ESI-MS	15
1.3.2 Study the binding sites between metal ions and A β peptide by tandem mass spectrometry	15
1.3.3 Study on the competitive substitution effect between Cu ²⁺ and Zn ²⁺ in the interactions with amyloid β -peptide by ESI-MS	16
References	17
Chapter 2 Study non-covalent complexes of Aβ peptide with metal ions by ESI-MS	25
2.1 Introduction	25
2.2 Experiments	26
2.2.1 Materials	26
2.2.2 Apparatus	27
2.2.3 Sample preparation	27

2.3 Results and Discussion	28
2.3.1 Peaks of A β (10-21)	28
2.3.2 Characterization analysis of non-covalent complex structure of A β (10-21) with metal ions by ESI-MS.....	30
2.3.3 Effect of Apparatus parameters on the A β -M non-covalent complex...	31
2.3.4 Effect of pH and molar ratio on the A β -M non-covalent complex	35
2.3.5 Effect of the ratio of organic solvent on the A β -M non-covalent complex.....	41
2.4 Conclusion	43
References	45
 Chapter 3 Study the binding sites between metal ions and Aβ peptide by tandem mass spectrometry	47
3.1 Introduction	47
3.2 The mass law of Aβ (10-21) peptide fragmentation	49
3.2.1 Materials	49
3.2.2 Experimental Methods.....	49
3.2.3 Results and Analyse	49
3.3 Experiments	53
3.3.1 Materials	53
3.3.2 Sample preparation	53
3.3.3 Apparatus	53
3.4 Results and Discussion	54
3.4.1 Zinc binding site	54
3.4.2 Copper binding sites	58
3.5 Conclusion	60
Reference	61
 Chapter 4 Study on the competitive substitution effect between Cu²⁺ and Zn²⁺ in the interactions with amyloid β-peptide by	

ESI-MS	62
4.1 Introduction	62
4.2 Experiments	64
4.2.1 Materials	64
4.2.2 Apparatus	64
4.2.3 Sample preparation	65
4.3 Results and Discussion	66
4.3.1 Effect of experimental conditions on competition.....	66
4.3.2 A β (10-21) peptide and the competition with copper or zinc	66
4.3.3 Effect of Peptide concentration and the ratio on competition.....	67
4.3.4 Effect of molar ratio on competition.....	69
4.3.5 Effect of incubation time on competition	72
4.4 Conclusion	73
Reference	75
Chapter 5 Summary	78
Appendix	80
Publications	89
Acknowledgement	90

摘要

老年痴呆症(Alzheimer's Disease, 简称AD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病,其症状主要表现为记忆力下降,思维障碍及行为异常等。随着社会的发展,人口老龄化速度的加快,AD已成为威胁人类晚年健康的一大隐患,对其治疗迫在眉睫。该病的病理特征之一是在大脑神经元外出现脑斑。该脑斑具有神经毒性,它的扩展将导致神经元萎缩、坏死。研究表明在AD患者大脑中淀粉样A β 多肽逐渐聚集、纤维化并与其它相关蛋白质、聚糖等共沉淀形成老年脑斑。诱导A β 多肽聚集的因素很多。据报道金属离子与A β 多肽聚集有直接的关系。铜、锌是人体必须的两种微量元素。本文着重讨论金属离子铜、锌对A β 多肽聚集的影响。

电喷雾质谱(ESI-MS)在生命科学中的研究中起着越来越重要的作用。特别是对非共价复合物的分析具有更高的灵敏度,更好的选择性,更快的分析速度和更可信的分析结果。本论文选取了A β (10-21)这样一个肽段来作为研究对象,这是一段是包括His¹³和His¹⁴(金属离子的主要作用位点)的最小的片段,以ESI-MS为主要技术来研究金属离子与A β (10-21)多肽的弱相互作用。

首先本论文系统分析了实验条件,包括pH值,温度,仪器参数,浓度等对于该类非共价复合物的形成及其离子强度的影响分析,通过系统分析测定参数及条件对A β 多肽与金属离子形成的非共价复合物离子的影响,初步建立了表征A β 多肽与金属离子形成的非共价复合物的ESI-MS分析方法。又通过对A β 多肽与金属离子的浓度及配比的分析,确定A β 多肽与金属离子的稳定性结合为1:1,并且随着金属离子浓度的增加,最大化学计量能达到1:4。

其次,本论文的结果表明,金属Cu²⁺和Zn²⁺与A β 多肽的复合物的质谱碎片相近,均在组氨酸残基His¹³和His¹⁴附近碎裂,表明两种金属离子诱导A β 多肽碎裂的规律相似。碎裂的规律显示N-端的亲水区域特别是组氨酸残基,是Cu²⁺和Zn²⁺金属离子与A β 多肽结合的主要位点。His¹³和His¹⁴与金属离子的结合对诱导A β (1-40)聚集的效应是非常显著的。

最后,本论文采用电喷雾质谱的方法研究了金属离子Cu²⁺和Zn²⁺与A β (10-21)的竞争取代效应。实验现象表明,Cu²⁺在与A β (10-21)多肽的相互作用过程中结合能力比锌强,Zn²⁺不能取代A β -Cu复合物中的Cu²⁺,然而,对于Cu²⁺而言,能很

容易的取代 Zn^{2+} 而不改变复合物的任何构象。因此可以推断，在一定条件下 Cu^{2+} 可以取代锌离子进而可以抑制 Zn^{2+} 诱导的 $\text{A}\beta$ 低聚物的形成。

关键词：老年痴呆症；电喷雾质谱； $\text{A}\beta$ 多肽；金属离子；非共价作用

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder of the central nervous system. It is recognized as a major public health problem which has a severe impact on human beings. A major pathological character is that senile plaques (SPs) occur in the brains of patients. SPs are neurotoxic and their extensive depositions cause neurodegeneration. The studies show that Amyloid β -peptides ($A\beta$ s) aggregate and accumulate, moreover, colocalize with numerous other associated protein and non-protein components to form SPs. There are many factors to induce the $A\beta$ aggregation. It has been reported that metal ions have a direct role in the aggregation of $A\beta$, however, no clear data reveals their binding sites on $A\beta$. Zinc and copper are essential trace metals in normal brain. Here, we have pay more attention to the effect of metal ions inducing the aggregation of $A\beta$.

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) plays an important role in life science research for its higher sensitivity, better selectivity, faster analysis speed and more reliable results, especially for non-covalent complexes. In this thesis, ESI-MS is the main technology to study the weak interaction between metal ions and the $A\beta$ peptides. In this paper, we selected a model peptide comprising 10-21 amino acid residues of the $A\beta$, i.e., $A\beta$ (10-21), as the minimal fragment including His¹³ and His¹⁴ to explore the characters of binding metal ions. Here we studied the $A\beta$ -metal complex by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

The experimental conditions were discussed firstly including pH, temperature, apparatus, concentrations, and so on. Initially, we established an ESI-MS analysis method to study non-covalent complexes of $A\beta$ peptide with metal ions, the investigation were determined by the effect of system parameters and conditions on the formation of $A\beta$ peptide with metal ions of non-covalent complex ions. Then the stoichiometry of peptide-metal complexes and metal ions binding sites were discussed

under the optimized experimental conditions. Our study revealed the stoichiometry of 1:1 for the general peptide–metal complexes. And the maximum binding number could reach four with the metal concentrations increased.

In addition, our results showed that both Cu^{2+} and Zn^{2+} metal binding induce specific cleavages near the histidines of the A β (10-21) sequence (H¹³ and H¹⁴), indicating their similarity in the metal coordination sphere. The significance of the N-terminal hydrophilic region, especially the histidine residues, is the primary metal binding sites of A β for both Cu^{2+} and Zn^{2+} . Coordination of metal ions with His¹³ and His¹⁴ has been found to be critical to induce A β (1–40) aggregation.

Finally, the competitive substitution effect between Cu^{2+} and Zn^{2+} in the interactions with A β was investigated by ESI-MS method. And the phenomena demonstrated that Cu^{2+} had a higher affinity for binding the peptide than Zn^{2+} . Zn^{2+} failed to substitute Cu^{2+} in the A β - Cu^{2+} complex with a quasi-helix conformation. However, in striking contrast to Zn^{2+} , Cu^{2+} effectively substitutes Zn^{2+} almost without disturbing the conformation of the complexes. Therefore, it can be inferred that Cu^{2+} under certain conditions may be able to inhibit Zn^{2+} -induced formation of A β oligomers.

Key Words: AD; ESI-MS; A β ; Metal ions; Non-covalent interaction

符号缩写表

符号	英文含义	中文含义
AD	Alzheimer's Disease	阿尔兹海默症
A/A β	Amyloid β -peptide	β -淀粉样蛋白
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry	电喷雾质谱
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization	基质辅助激光解吸电离
TOF-MS	Time of flight mass spectrometry	飞行时间质谱
CD	Circular dichroism	圆二色谱
UV	Ultraviolet	紫外光谱
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
X-ray	X-ray crystallography	X 晶体衍射
H/His	Histidine	组氨酸
Y/Tyr	Tyrosine	酪氨酸
E/Glu	Glutamic acid	谷氨酸
V/Val	Valine	缬氨酸
Q/Gln	Glutamine	谷氨酰胺
K/Lys	Lysine	赖氨酸
L/Leu	Leucine	亮氨酸
F/Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸
A/Ala	Alanine	甘氨酸
A β -M	Complex of A β -metal	A β -金属复合物

第一章 绪论

1.1 老年痴呆症

老年痴呆症，又称阿尔茨海默症(Alzheimer's Disease, 简称 AD)，是人体的 一种与年龄相关的神经退行性疾病，患者会出现记忆功能减退，语言障碍，时间 和空间定向力障碍，智力低下，思维迟钝，计算力和判断力差，个性改变，生活 和工作的主动性丧失等症状，给患者及其家属乃至整个社会都带来了沉重的负担 [1-5]。

据美国公共健康机构报告，在美国，2000 年时 AD 患者即有 400 万人，有 75%的人年龄在 65 岁以上，每年有 10 万美国人死于此病，并且患病人数还在急剧增加，AD 已成为仅次于心血管病、癌症、脑中风的第 4 大死亡杀手。1991 年美国用于 AD 患者的费用达 1131 亿美元，平均每例 AD 的直接费用为每年 4.7 万美元，如果计入间接费用，每例可消耗 17.4 万美元^[6]。据报道，日本目前有 60 万老年性痴呆症病人，占总人口的 0.56%，2010 年病人数可达 110 万人以上。在我国，根据国家药监局南方医药经济研究所调查统计，患 AD 的老年人已有 500 万之多，就诊率仅为 22.8%左右，死亡率占 8.86%。不久的将来，我国将进入老龄社会，同时伴随着一个不可忽视的问题，即老年痴呆症的发病率在逐年增高，而且痴呆已不是老年人的“专利”。四五十岁就痴呆的人，数量也在逐年增加，患老年痴呆的年龄在提前，老年痴呆逐步呈现年轻化趋势。老年性痴呆症 50 岁以前罕见，但随着年龄增高发病率增加，有资料显示，60 岁以上的人群中占 10%，75 岁以上的人群中将占 20%，85 岁以上的人群中将占 40%~50%，再往上年龄每增加 5 岁，发病率增加 1 倍，故此，随老龄人口的不断增长，AD 患者的群体会不断扩大。我国老年人口增长迅速，目前 60 岁以上的老年人口已达 1.26 亿，占世界老年人口的 1/5，居世界第一位，预计到 2024 年将突破 3 亿。尤其是上海进入老龄化社会已整整 20 年，到 1998 年底，60 岁以上的老年人已达 235.57 万人，占全市总人口的 18%。我国最近对北京地区 55 岁以上人群痴呆病调研的结果表明，55 岁以上痴呆症患病率为 4.7%，65 岁以上为 7.8%。上海地区 55 岁以上人群中，4.5%病人患严重痴呆，14.4%患轻度痴呆^[7]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库